第 28 卷 第 4 期
2016年 7 月
腐蚀科学与防护技术
CORROSION SCIENCE AND PROTECTION TECHNOLOGY
Vol.28 No.4
Jul. 2016

专题介绍

从新的视角理解生物膜——微生物防腐蚀研究进展

许 萍 翟羽佳 王 婧 张雅君 司 帅 魏智刚

北京建筑大学 城市雨水系统与水环境省部共建教育部重点实验室 北京 100044

摘要: 综述了近年来国内外微生物防腐蚀的研究现状,系统地总结了微生物防腐蚀机理,包括生物膜内微生物分泌缓蚀剂和抗菌剂、生物膜内微生物通过呼吸作用消耗阴极去极化剂以及微生物胞外聚合物抑制微生物附着、形成钝化保护层和替代阳极等防腐蚀机制,阐述了存在的问题和未来的发展方向。

关键词: 微生物防腐蚀 防腐蚀机理 综述 生物膜 胞外聚合物

中图分类号: TG172 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-6495(2016)04-0356-05

1 前言

生物膜是一群嵌入在自身所产生的胞外聚合物 (EPS) 中、聚集在一起并不可逆地吸附在基底或界面上的固着态微生物群落[1]。除了水和细菌外,生物膜中还包括EPS、吸附的营养物质、细菌的代谢产物以及裂解产物等。

生物膜作为地球上记录最早、最成功的一种生命形式[2],可以存在于几乎所有的物体表面,如岩石、沉积物、土壤、皮肤、牙齿以及各类人工构筑物等。自首次发现并描述了假牙上牙垢生物膜后,人类对生物膜的不利影响有了较为深入的了解和认识。如工业冷却水系统中,黏附在凝汽器表面的生物膜会降低传热效率、增加水泵能耗[3-5];生活饮用水系统中,管壁生物膜会导致输配水管网消毒效率下降、水质恶化[6];牙齿表面,牙菌斑生物膜可诱发龋病和牙周病等[7]。在材料领域,在各类金属构筑物、输配水管道管件以及设备中,生物膜的形成和生长往往会引发微生物腐蚀从而加速金属的腐蚀进程。1892年Garrett[8]发表了第一篇关于微生物腐蚀 (MIC) 的文章;其后,多数研究人员主要致力于微生物腐蚀机理及其控制方法的研究[9-11]。然而近年来新的研究发现[12],某些生物膜不仅没有加剧金属的腐蚀,反而起到了抑制腐蚀、保护金属的作用。本文阐述了微生物防腐蚀 (MICI) 的研究现状与机理,指出了目前存在的问题以及未来的发展方向,以期对MICI的相关研究提供参考。

定稿日期: 2015-10-21
基金项目: 国家自然科学基金项目(51578035);北京建筑大学基金项目 (00331615008);城市雨水系统与水环境省部共建教育部重点实验室项目 (PXM2014014210000057) 资助
作者简介: 许萍,女,1971年生,博士,副教授
通讯作者: 翟羽佳,E-mail: zyj9241@126.com,研究方向为基于微生物EPS的复合涂层对碳钢的防腐效果
DOI: 10.11903/1002.6495.2015.293

2 微生物防腐蚀研究现状

微生物具有防腐蚀效果的概念在1988年首次由Pedersen等[13]提出。其后几年,一些学者通过实验相继证实了MICI的存在。Earthman等[14]发现好氧菌 Pseudomonas fragi 和兼性好氧菌 Escherichia coli DH5α生物膜在氧气充足的条件下均可抑制碳钢1018的腐蚀;Jayaraman等[15]发现,短芽孢杆菌生物膜在厌氧环境中可以阻止硫酸盐还原菌的生长并降低了碳钢和不锈钢的腐蚀。Dubiel等[16]研究了铁还原菌对金属的腐蚀影响,发现在厌氧铁还原菌单独存在的情况下可抑制金属腐蚀。Zuo等[17,18]也有类似的发现。Örnek等[19]发现枯草芽孢杆菌生物膜对铝合金2024有较明显的缓蚀作用。相关研究认为,生物膜、微生物及其代谢产物可以降低某些腐蚀正相关参数,如O_2含量、电子转移速率、铁释放速率等[20-23]。

金属界面微生物膜所形成的天然屏障,被认为是MICI的主要作用机制,而EPS中含有多糖、蛋白质、脂肪酸以及无机物等其他小分子化合物,有助于生物膜的形成,因此多数研究主要集中在EPS防腐蚀方面。Stadler等[24]研究发现,细菌分泌的EPS中含有葡聚糖,可以防止金属腐蚀,并通过实验证实 Desulfovibrio vulgaris 的EPS能够通过抑制微生物附着和生物膜消耗氧气两方面作用抑制低碳钢的腐蚀。随后的另一研究也证实,高合金钢上涂有EPS

的区域,微生物数量明显少于未涂EPS的区域[25]。Roux等[26]研究了胞外多糖EPS180对混凝土中钢筋腐蚀的影响,结果表明,在水泥中添加EPS180后,钢筋的抗腐蚀性能增强。Finkenstadt等[27]也发现提纯的Leuconostoc mesenteroides的EPS对低碳钢具有保护作用。Dong等[28]在研究中提出:由嗜热硫酸盐还原菌分泌的EPS吸附在金属表面,可以阻碍阴极吸氧反应的发生,从而减缓金属腐蚀。

国内对微生物防腐蚀的研究处于起步阶段。杜向前[29]发现海洋好氧生物膜抑制铝合金腐蚀。并且铁还原菌Shewanella.algae Y01的生物膜减缓了316L不锈钢的腐蚀。刘彬等[30]进一步通过动电位极化曲线发现,天然海水微生物膜通过抑制阳极反应而抑制了不锈钢点蚀的发生。李付绍等[31]发现:硫酸盐还原菌(SRB)虽然能使不锈钢发生点蚀,但SRB生物膜能保护点蚀以外完好的表面。Jin等[32]将再生水管壁上的生物膜收集培养,对比加入不同浓度EPS的再生水对铸铁片的腐蚀影响,结果表明EPS对铸铁有防腐蚀作用;同时,培养时间的长短可以影响防腐蚀效果。

3 微生物防腐蚀机理

3.1 分泌缓蚀剂和抗菌剂

生物膜中的某些微生物可分泌缓蚀剂或抗菌剂,从而减缓金属的腐蚀。Jayaraman等[15]研究发现,枯草芽孢杆菌(Bacillus licheniformis)分泌的聚合谷氨酸酯(γ-polyglutamate)和地衣芽孢杆菌(Bacillus subtilis)分泌的聚天冬氨酸(polyaspartate)均对铝2024有缓蚀作用;其中聚合谷氨酸酯可使铝合金2024的腐蚀速率减缓90%。聚合谷氨酸酯和聚天冬氨酸的结构中都含有铝螯合羧基团,这种羧基团可以与铝结合生成铝/阴离子多肽氧化膜,阻隔微生物的黏附与侵蚀作用并减少界面上的电子传输,从而减缓铝合金的腐蚀,如图1。

短芽孢杆菌(Bacillus Brevis)分泌的短杆菌肽-S (gramicidin S),是一种环状肽类抗生素,主要抑制革兰氏阳性菌,可以阻止SRB的生长并且降低碳钢和不锈钢的腐蚀速度[15,33],如图2。Zuo等[17]研究发现,碳钢表面附着短芽孢杆菌生物膜后,在有SRB的环境中,碳钢表面未发现铁硫化合物,也很少有SRB附着,同时碳钢的腐蚀速率也降低了2~10倍;说明其分泌物短杆菌肽-S通过抑制SRB在碳钢表面的附着减缓了碳钢的腐蚀。

3.2 消耗阴极去极化剂

在好氧条件下,好氧微生物和一些兼性微生物能够通过呼吸作用,减少金属表面的氧气等电子受体,阻碍阴极去极化过程而抑制金属的腐蚀。Jayaraman等[14]研究发现,好氧菌Pseudomonas fragi和兼性好氧菌Escherichia coli DH5α可使碳钢1018的腐蚀速率降低约10~20倍;同时,与加入氯霉素灭活的实验组对比,在氧气充足的条件下,灭菌的实验组中,碳钢1018的腐蚀速率高出一个数量级。上述实验说明了微生物呼吸作用的重要性,Pseudomonas fragi等细菌[14]通过呼吸作用消耗氧气,使金属与水体交界处形成缺氧区,同时EPS阻止外界氧气进入,减少了阴极去极化剂氧气的数量,从而抑制了碳钢的腐蚀。Jayaraman等[14]进一步采用15种不同的纯化菌株(分属于7类菌属,均能够形成生物膜),研究在混合LB培养基中和人工海水VNSS培养基中SAE 1018碳钢的腐蚀行为;结果表明,生物膜的形成对SAE 1018碳钢腐蚀的抑制作用是一种普遍的现象,并且生物膜的性质(例如致密的生物膜和稀疏的生物膜等)决定其腐蚀抑制程度[23]。Dubiel等[16]也发现,铁还原菌通过呼吸作用可以抑制金属腐蚀。铁还原菌将腐蚀产物中的Fe (III)作为电子受体,将Fe (III)还原为Fe (II),Fe (II)继续与氧气发生反应,直至将氧气消耗尽。同时,Lee等[34,35]发现形成的二价铁氧化物也对金属起到保护作用。铁还原菌间接地通过Fe (II)消耗氧气减少电子受体数量而达到防腐蚀的效果。Dong等[28]研究不同温度条件下,嗜热SRB及其代谢分泌物对碳钢腐蚀行为的影响,发现细菌生长代谢消耗碳钢试片表面的溶解氧并有效地减少了阴极反应,同时生物膜的形成也阻碍了阳极溶解。

消耗电子受体的过程很大程度上依附于生物膜中活细胞的数量,因此对于微生物直接参与并起主

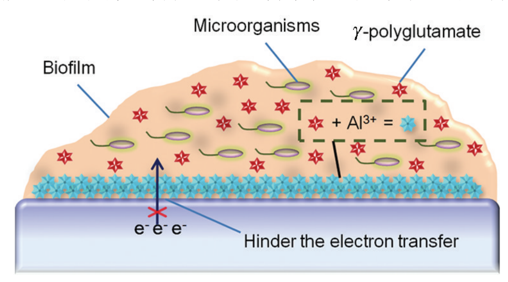


图1 微生物分泌缓蚀剂抑制金属腐蚀

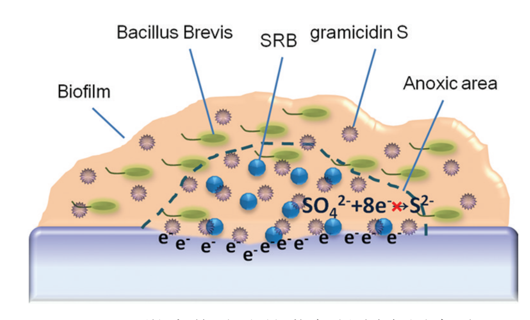
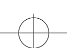


图2 微生物分泌抗菌剂抑制金属腐蚀



要作用的MICI过程，微生物的代谢活性十分重要。此外，生物膜内微生物数量及其生长代谢速率受温度、pH值、溶解氧、碳源及营养物等环境条件的制约，因此，不同环境条件下，生物膜中微生物组成、结构与代谢活性不同，防腐蚀效果也存在差异。

3.3 EPS防腐蚀

3.3.1 抑制微生物附着　Stadler等[25]发现，从脱硫弧菌 (Desulfovibrio vulgaris) 中提取的EPS有抑制脱硫弧菌附着于金属表面的能力，脱硫弧菌是化能有机营养型或混合营养型，是腐蚀菌SRB的一种。荧光显微镜 (FM) 观察结果表明，在涂有EPS的高合金表面很少有脱硫弧菌附着，而没有涂EPS的高合金表面则附着大量的脱硫弧菌。EPS在金属表面形成的非均匀膜[35]，可以有效的阻隔细菌与金属基底的黏附作用，从而减缓MIC的发生。

目前，关于EPS抑制微生物附着的机理并不是很明确，有研究认为，可能与群体感应有关[36]。群体感应是指细菌能自发产生、释放一些特定自身诱导物质 (auto-inducer AI) 的信号分子，并能感知其浓度变化、调节微生物的群体行为的调控系统，像分泌胞外聚合物、芽孢形成、菌体发光、色素产生、抗生素形成，尤其在生物膜的发展过程中有很重要的作用，包括微生物附着、运动性、生长成熟、脱落。EPS中存在的某种物质，可能破坏微生物群体感应，使微生物之间失去联系，从而减少微生物在金属表面的附着。

Koutsoudis等[37]研究认为，EPS主要通过阻止AI信号分子的生成或转录破坏微生物的群体感应，可能的途径如下：(1) 减少LuxR受体蛋白活性和减少LuxI合成酶活性；(2) 阻止AI信号分子的产生。三氯生是一种有效的烯酰基ACP还原酶抑制剂，烯酰基ACP还原酶是酰基ACP的生成酶，后者是生成AI信号分子的重要物质之一，通过加入三氯生可以减少信号分子的数量，从而切断群体感应；(3) 酶降解AI信号分子。破坏内酯酶和酰基转移酶可以水解信号分子的内酯键，使信号分子的活性降低，使其不能与受体蛋白结合，如枯草芽孢杆菌所产生的AiiA酶可以降解信号分子；(4) 仿造信号分子。可以与AI结构类似的物质，与相应的受体蛋白结合，但不能转录出正确的信息，如呋喃酮。

3.3.2 钝化保护层　EPS在金属表面形成致密的钝化保护层 (Passive layer)，阻止氧气等阴极去极化剂达到金属表面，阻断了电子转移，从而达到防止金属腐蚀的效果。Shobhana等[38]研究了Pseudomonas alcaligenes EPS和Pseudomonas cichorii EPS对低碳钢的防腐蚀作用，发现在有P.cichorii存在的条件下低碳钢表面形成的腐蚀产物层较为致密，其主要成分除铁的氧化物外，还含有磷酸铁盐和Fe-EPS化合物；与无菌对照组对比后认为，Fe-EPS化合物对钝化保护层的形成起到了关键作用。Finkenstadt等[27]研究发现，EPS的防腐蚀效果具有菌种特异性，即使是同一菌种在不同培养条件下产生的不同菌株所分泌的具有相似结构的多糖，也呈现出不同的防腐蚀能力。但不同来源的EPS组分不同，却具有相似的官能团[32]。Ghafari等[39]研究发现，EPS中多糖类物质的羧基基团中含有C—O、C=O键，可以与铁离子等金属离子络合形成致密的保护层。因此，EPS在金属表面形成的钝化保护层，可能主要依赖其含有的官能团，而非多糖的结构。此外，胞外多糖中羧基、糖醛酸和非碳水化合物取代基上的阴离子官能团，如磷酸、硫酸、甘油、丙酮酸、丁二酸等也对钝化保护层的致密性有贡献[40]。

实际上，EPS与金属离子的结合，既可能加速腐蚀，也可能延缓腐蚀。研究认为，正是初期的快速腐蚀成就了后期EPS钝化层的形成。Jin等[41]研究发现，在初期吸附阶段，由于EPS与Fe^{3+}不断结合，加速了阳极铁的溶出从而促进腐蚀；当吸附达到最大值，且EPS与Fe^{3+}结合反应达到饱和时，结合态EPS、吸附态EPS以及腐蚀产物组成的保护膜作为天然屏障阻碍了腐蚀反应的进行。

目前只发现少数几种微生物的EPS有防腐蚀效果，且EPS并不是对所有的金属都有防腐蚀作用。Stadler等[24]开展了不同菌种EPS对纯铁、碳钢和不锈钢的腐蚀影响实验，发现Pseudomonas cichorii EPS和Pseudomonas flava EPS对不锈钢有较明显的腐蚀抑制作用；D.vulgaris EPS和D.indonesiensis EPS对碳钢有保护作用，但对纯铁的腐蚀抑制作用不明显。Eimutis等[42]研究了Bacillus mycoides生物膜对铝、锌和低合金的防腐蚀影响，发现Bacillus mycoides生物膜加速了锌腐蚀，减缓了铝腐蚀，对低合金并没有明显的影响。不同种类微生物EPS中的羟基、羧基数量及结构位置不同，可能是EPS与金属离子结合存在差异的主要原因，还有待进一步的深入研究。

3.3.3 替代阳极　EPS-Fe配合物中的一些主要官能团作为阳极电子受体参与界面电化学反应，通过阻挡并消耗电子受体而起到保护金属基底的作用。Jin等[32]研究了EPS中主要官能团在实验前后的变化，发现EPS浸涂铸铁试片后，C=O和C—(O，N) 官能团的数量减少，而C—(C，H) 官能团数量有所上升。这可能是由于EPS中C=O和C—(O，N) 官

能团，替代原本的阳极金属与阴极电子受体反应，因此转变为了C—(C，H) 键。目前关于这方面研究的报道还相对较少。

4 发展方向与前景

传统的防腐措施大多利用含锡、铜、锌等重金属或挥发性有机物的涂料保护易腐蚀材料，这些涂料虽然具有较好的防腐效果且易于应用，但其同时具有危害人体健康和污染环境的潜在风险[43]。因此，开发可再生的环境友好型防腐技术是目前的必然趋势，MICI研究为开发新的腐蚀防护措施提供了新的思路和途径。目前MICI的研究还有待深入，未来应着重开展以下几方面的研究：

(1) 目前多数MICI研究主要集中在单一菌种生物膜对金属的防腐蚀作用，但实际，生物膜中含有多种微生物，其与金属的相互作用机制更为复杂。未来应逐步开展微生物协同防腐蚀机理与机制的研究。

(2) MICI是多个影响因素共同作用的结果，如微生物呼吸作用、代谢途径、分泌酶、代谢副产物等，温度、pH、碳源、营养源、溶解氧等环境条件以及金属种类、粗糙度等界面性质，今后应加强上述因素对MICI的影响机制研究。

(3) 在推广应用方面，应加强MICI的安全性、工程性和可控性研究，如生物膜及其微生物本身对水质的影响研究；EPS的工业化应用和生产研究；不同金属界面生物膜中优势菌种的可控环境条件研究等。

参考文献

[1] Rodney M D, Costerton W. Biofilm: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms [J]. Clin. Micro. Rev., 2002, 15: 167

[2] Rodney M D. Biofilm: Microbial life on surfaces [J]. Emerg. Infect. Dis., 2002, 8: 881

[3] 刘稚红, 董滨. 循环冷却水系统中生物粘泥的控制途径 [J]. 中国给水排水，2008, 24(12): 22

[4] 陈娟, 类延华, 高冠慧等. 硫酸盐还原菌生物膜下铜镍锡合金的腐蚀行为 [J]. 中国腐蚀与防护学报, 2011, 31(3): 231

[5] 叶琴, 李克娟, 郭佩佩等. 油田污水中碳钢表面生物膜生长规律及腐蚀电化学行为 [J]. 腐蚀科学与防护技术, 2013, 25(3): 195

[6] 孙慧芳, 石宝友, 王东升. 供水管网内壁生物膜的特征及其对水质的影响 [J]. 中国给水排水, 2011, 27(21): 40

[7] 凌均棨. 牙菌斑生物膜的研究进展 [J]. 中华口腔医学研究杂志(电子版), 2008, 2(2): 1

[8] Garrett J H. The Action of Water on Lead Lewis [M]. London, 1891

[9] 樊友军, 皮振邦, 华萍等. 微生物腐蚀的作用机制与研究方法现状 [J]. 材料保护, 2001, 34(5): 18

[10] 刘宏芳, 汪梅芳, 许立铭. 微生物腐蚀中生物防治措施的研究 [J]. 腐蚀与防护, 2002, 23(12): 519

[11] 赵莉, 葛红花, 申晶等. 三种不同体系的微生物腐蚀及控制 [J]. 腐蚀与防护, 2011, 32(3): 200

[12] Videla H A, Herrera L K. Understanding microbial inhibition of corrosion. A comprehensive overview [J]. Int. Biodeterior. Biodegrad., 2009, 63(7): 896

[13] Pedersen A, Kjelleberg S, Hermansson M. A screening method for bacterial corrosion of metals [J]. Microbiol. Methods., 1988, 8(4): 191

[14] Earthman J C, Jayaraman A, Wood T K. Corrosion inhibition by aerobic biofilms on SAE 1018 steel [J]. Appl. Microbiol. Biot., 1997, 47(1): 62

[15] Jayaraman A, Ornek D, Duarte D A, et al. Axenic aerobic biofilms inhibit corrosion of copper and aluminum [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1999, 52: 787

[16] Dubiel M, Hsu C H, Chien C C, et al. Microbial iron respiration can protect steel from corrosion [J]. Appl. Environ. Microbiol., 2002, 68: 1440

[17] Zuo R, Örnek D, Syrett B C, et al. Inhibiting mild steel corrosion from sulfate-reducing bacteria using antimicrobial-producing biofilms in Three-Mile-Island process water [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2004, 64: 275

[18] Zuo R. Biofilms: Strategies for metal corrosion inhibition employing microorganisms [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2007, 76 (6): 1245

[19] Örnek D, Jayaraman A, Syrett B, et al. Pitting corrosion inhibition of aluminum 2024 by Bacillus biofilms secreting polyaspartate or γ-polyglutamate [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2002, 64: 651

[20] Pedersen A, Hermansson M. The effects on metal corrosion by Serratia marcescens and a Pseudomonas sp [J]. Biofouling, 1989, 1: 313

[23] Jayaraman A, Cheng E T, Earthman J C, et al. Importance of biofilm formation for corrosion inhibition of SAE 1018 steel by axenic aerobic biofilms [J]. Ind. Microbiol., 1997, 18: 396

[24] Stadler R, Fuerbeth W, Harneit K, et al. First evaluation of the applicability of microbial extracellular polymeric substances for corrosion protection of metal substrates [J]. Electrochim. Acta, 2008, 54: 91

[25] Stadler R, Wei L, Fürbeth W, et al. Influence of bacterial exopolymers on cell adhesion of Desulfovibrio vulgarison high alloyed steel: Corrosion inhibition by extracellular polymeric substances (EPS) [J]. Mater. Corros., 2010, 61(12): 1008

[26] Roux S, Bur N, Ferrari G, et al. Influence of a biopolymer admixture on corrosion behaviour of steel rebars in concrete [J]. Mater. Corros., 2010, 61(12): 1026

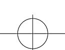
[27] Finkenstadt V L, Cote G L, Willett J L. Corrosion protection of low-carbon steel using exopolysaccharide coatings from Leuconostoc mesenteroides [J]. Biotechnol. Lett., 2011, 33(6): 1093

[28] Dong Z H, Liu T, Liu H F. Influence of EPS isolated from thermophilic sulphate-reducing bacteria on carbon steel corrosions [J]. Biofouling, 2011, 27(5): 487

[29] 杜向前. 海洋好养生物膜对金属的腐蚀抑制行为研究 [D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2012

[30] 刘彬, 段继周, 侯保荣. 天然海水中微生物膜对316L不锈钢腐蚀行为研究 [J]. 中国腐蚀与防护学报, 2012, 32: 48

[31] 李付绍, 安茂忠. 硫酸盐还原菌生物膜在不锈钢腐蚀过程中的作用 [J]. 材料保护, 2012, 45: 27



[32] Jin J, Wu G, Zhang Z, et al. Effect of extracellular polymeric substances on corrosion of cast iron in the reclaimed wastewater [J]. Bioresour. Technol., 2014, 165(8): 162

[33] Jayaraman A, Hallock P J, Carson R M, et al. Inhibiting sulfate-reducing bacteria in biofilms on steel with antimicrobial peptides generated in situ [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1999, 52(2): 267

[34] Lee A K, Newman D K. Microbial iron respiration: Impacts on corrosion processes [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2003, 62(2/3): 134

[35] Lee A K, Buehler M G, Newman D K. Influence of a dual-species biofilm on the corrosion of mild steel [J]. Corros. Sci., 2006, 48(1): 165

[36] Daniels R, Verleyden Jos, Michiels J. Quorum sensing and swarming migration in bacteria [J]. FEMS Microbiol. Rev., 2004, 28(3): 261

[37] Koutsoudis M D, Dimitrios T, Minogue T D, et al. Quorum-sensing regulation governs bacterial adhesion, biofilm development, and host colonization in Pantoea stewartii subspecies stewartii [J]. PNAS, 2006, 103(15): 5983

[38] Chongdar S, Gunasekaran G, Kumar P. Corrosion inhibition of mild steel by aerobic biofilm [J]. Electrochim. Acta, 2005, 50(24): 4655

[39] Ghafari M D, Bahrami A, Rasooli I, et al. Bacterial exopolymeric inhibition of carbon steel corrosion [J]. Int. Biodeterior. Biodegrad., 2013, 80(5): 29

[40] Huo M, Zheng G, Zhou L. Enhancement of the dewaterability of sludge during bioleaching mainly controlled by microbial quantity change and the decrease of slime extracellular polymeric substances content [J]. Bioresour. Technol., 2014, 168(3): 190

[41] Jin J, Guan Y. The mutual co-regulation of extracellular polymeric substances and iron ions in biocorrosion of cast iron pipes [J]. Bioresour. Technol., 2014, 169c(5): 387

[42] Eimutis J, Rimantas R, Albinas L, et al. Influence of wild strain Bacillus mycoides on metals: From corrosion acceleration to environmentally friendly protection [J]. Electrochim. Acta, 2006, 51 (27): 6085

[43] Karlsson J, Ytreberg E, Eklund B. Toxicity of anti-fouling paints for use on ships and leisure boats to non-target organisms representing three trophic levels [J]. Environ. Pollut., 2010, 158(3): 681

